

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



542708

(43) Date de la publication internationale
12 août 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/067558 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/435, C12N 15/11

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2004/000127

(22) Date de dépôt international :

21 janvier 2004 (21.01.2004)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

03/00622 21 janvier 2003 (21.01.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **THER-APTOSIS** [FR/FR]; Pasteur Bio Top, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BORGNE, Annie** [FR/FR]; 10, rue de Budapest, F-75009 Paris (FR). **REBOUILLAT, Dominique** [FR/FR]; 36, rue du Hameau, F-75015 Paris (FR). **JACOTOT, Etienne** [FR/FR]; 171, rue Lecourbe, F-75015 Paris (FR).

(74) Mandataires : **PEAUCELLE, Chantal** etc.; Cabinet Armengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MEANS FOR REGULATING THE EXPRESSION OF HUMAN ISOFORMS OF ANT

(54) Titre : MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES HUMAINES DE L'ANT

(57) Abstract: ARNi which can selectively inhibit expression of an isoform of ANT, characterized in that said ARNi are an ARN duplex, one of the strands being highly homologous to a fragment of ARNm coding for said isoform of ANT.

(57) Abrégé : ARNi capables d'inhiber sélectivement l'expression d'une isoforme de l'ANT, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un duplex d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un fragment de l'ARNm codant pour ladite isoforme de l'ANT.



WO 2004/067558 A1

« MOYENS POUR LA REGULATION DE
L'EXPRESSION DES ISOFORMES
HUMAINES DE L'ANT »

L'invention a pour objet des moyens pour la régulation de l'expression des isoformes humaines de l'ANT, plus particulièrement des duplex d'ARN interférants (ARNi) et leurs applications pour ladite régulation et les applications des ADNc codant pour les isoformes.

Le translocateur nucléotidique à adénine (ANT) est la protéine la plus abondante de la membrane interne des mitochondries. L'ANT possède deux fonctions distinctes : c'est d'une part, le responsable du transport des nucléotides à adénine à travers la membrane mitochondriale interne (import de l'ADP pour la phosphorylation oxydative ; export d'ATP vers le cytosol pour le métabolisme général). D'autre part, l'ANT joue un rôle essentiel lors de la phase mitochondriale de l'apoptose. En effet, l'ANT peut adopter une conformation de pore non-spécifique, ce qui conduit à la perméabilisation des membranes mitochondriales et au déclenchement de la mort cellulaire (Kroemer & Reed 2000).

20

Les gènes codant pour les ANT ont été clonés dans un bon nombre d'espèces telles que la levure, diverses plantes, le bœuf, le rat, la souris et l'homme. Toutes ces espèces possèdent plusieurs isoformes, et la structure des gènes est hautement conservée avec une organisation en 4 exons séparés par 3 introns. L'ANT humain existe sous trois isoformes (ANT1, ANT2, et ANT3) codées par trois gènes nucléaires différents qui ont été clonés et séquencés.

L'ANT1 (chromosome 4) est principalement exprimé dans le cœur et les muscles squelettiques. On connaît une maladie

héréditaire chez l'homme liée à une mutation de l'ANT 1 (substitution de l'alanine 114 en proline). Il s'agit de l'ophtalmoplégie progressive externe (affection rare caractérisée par d'importantes délétions de l'ADN mitochondrial). L'ANT2 (chromosome X) est très faiblement exprimé dans les tissus matures. Les plus forts niveaux d'expression de l'ANT2 sont observés dans les cellules en prolifération telles que les myoblastes et les cellules tumorales. L'ANT2 est aussi spécifiquement trouvé dans les cellules transformées par le virus SV40, ainsi que les lignées dépourvues d'ADN mitochondrial (rho⁰). L'ANT3 (région pseudoautosomale des chromosomes X et Y) est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus différenciés.

L'apoptose est un processus de suicide cellulaire qui se déroule en trois phases : une phase pré-mitochondriale (hétérogène), une phase mitochondriale (décision de mort), et une phase de dégradation (« putréfaction » de la cellule). L'ANT, une protéine insérée dans la membrane interne des mitochondries, a la capacité de former un pore qui change radicalement le rôle de la mitochondrie : lorsque l'ANT est dans son état de PORE OUVERT la mitochondrie devient un organe de destruction de la cellule.

Les points suivants sont aujourd'hui établis :

- Il est possible de tuer des cellules *in vitro* en induisant la fonction pore de l'ANT (Belzac, Jacotot et al., *Cancer Res.* 2001 Feb 15. 61(4):1260-4).
- Il est possible de protéger des cellules cardiaques *ex vivo* (cœur reperfusé isolé) en

bloquant la fonction pore de l'ANT (Di Lisa et al., *J Biol Chem.* 2000 Nov. 9).

- Il est possible de protéger des neurones in vivo de la mort consécutive à l'ischémie cérébrale en inhibant l'ANT (Cao et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Apr. 21(4):321-333).

5 L'ANT est donc un point de contrôle majeur de l'apoptose et est régulé par des protéines endogènes comme le suppresseur de tumeur Bax (pro-apoptotique) et l'oncoprotéine Bcl-2
10 (anti-apoptotique). L'ANT est aussi régulé par des protéines virales comme Vpr (pro-apoptotique issu du VIH) et vMIA (anti-apoptotique issu du CMV). C'est donc une cible idéale pour lutter contre les dérégulations
15 pathologiques de l'apoptose.

Des données récentes ont révélé que l'ARN double-brin (ARNdb) induit l'extinction de l'expression de gènes dont la séquence est très homologue à la séquence de l'un des
20 deux brins d'ARN du duplex. Ce phénomène, appelé interférence à ARN ou ARNi conduit à la dégradation des ARN messagers (Hammond et al., 2001, Sharp, 2001). Tuschl et coll. ont démontré que l'introduction dans des cellules de mammifères d'un duplex ARN de 21 nucléotides (small
25 interfering RNA ou siRNA) conduit à l'inhibition spécifique de l'expression génique (Elbashir et al., 2001). Après transfection, les siRNA agissent de pair avec des composants cellulaires (l'enzyme DICER et le complexe RISC) afin d'abolir l'expression du gène cible.

30 Les inventeurs ont constaté qu'il était possible de réguler l'apoptose à des fins thérapeutiques en agissant sur le niveau d'expression des isoformes humaines de l'ANT de manière sélective.

En particulier, il s'est avéré que des ARNi conçus à partir de régions définies de 21 nucléotides de la séquence codante de chaque isoforme de l'ANT a permis d'élaborer des
5 ARNi duplex capables, après transfection, d'abolir sélectivement l'expression de chaque isoforme.

L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux produits qui associés à tout procédé de transfert d'acides
10 nucléiques sont utilisables en thérapeutique humaine et animale.

L'invention vise des ARNi capables d'inhiber sélectivement l'expression d'une isoforme de l'ANT, caractérisés en ce
15 qu'il s'agit de duplex d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un fragment de l'ARNm codant pour ladite isoforme de l'ANT.

Avantageusement, les ARNi de l'invention sont des siRNA
20 (ARN d'interférence de petite taille) de 18 à 25 nucléotides, plus particulièrement de 21 nucléotides.

Des ARNi préférés sont choisis parmi les duplex avec des brins de séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 ; SEQ ID N°3 et
25 SEQ ID N°4 ; SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 :

SEQ ID N°1 : 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3'

SEQ ID N°2 : 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3'

30 SEQ ID N°3 : 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3'

SEQ ID N°4 : 5'-cuuauucgacugaucugcdTdT-3'

SEQ ID N°5 : 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3'

SEQ ID N°6 : 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3'

L'invention vise également des constructions contenant au moins un ARNi tel que défini ci-dessus ou des séquences d'ADN codant pour chacun des brins de ces ARNi.

5

Dans un mode de réalisation de l'invention, la construction est caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur facilitant son administration, son passage au travers de membranes, tissus ou de téguments biologiques, notamment
10 membranes cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes nucléaires, la peau, les muqueuses, les parois endothéliales, la barrière hémato-encéphalique, ainsi que sa biodisponibilité, stabilité et sa pharmacodistribution tel qu'un peptide, un liposome, des nanoparticules
15 (nanosphères, nanotubes), un oligomère non naturel tels que des polymères d'urée.

Dans un autre mode de réalisation, la construction est caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur
20 permettant le transfert d'acides nucléiques, tels que rétrovirus (Barton and Medzhitov, PNAS, 2002, vol. 99 (23) : p 14943-14945), transposons, adénovirus (Xia et al. ; Nature Bidech, 2002, Vol. 20, p1005-1010), plasmides (Brummelkamp et al., Cancel Call, 2002, p 243-247.

25

L'invention vise en outre les compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un ARNi tel que défini ci-dessus, ou une construction telle que définie plus haut, en
30 association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme injectable.

D'autres formes de présentation sont adaptées à l'administration par voie orale, parentérale, rectale ou topique (Levis et al., Nature Genetics, 2002, vol. 32, p107-108).

Les ARNi, constructions ou compositions pharmaceutiques tels que définis ci-dessus sont caractérisés en ce qu'ils ont la capacité de réguler (induire ou inhiber) la perméabilisation des membranes mitochondriales et la mort cellulaire de type apoptotique, nécrotique, autophagique et mécanismes apparentés.

Les compositions de l'invention permettent la régulation de l'expression des isoformes humaines de l'ANT et à ce titre sont particulièrement utiles pour le traitement de pathologies liées à des dérégulations de l'apoptose et des autres formes de mort cellulaire apparentées.

L'invention concerne donc en partie l'utilisation des siRNA-ANT1, siRNA-ANT2, ANRsi-ANT3 pour induire/favoriser (siRNA-ANT2) ou au contraire inhiber (siRNA-ANT1 et/ou siRNA-ANT3) la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et l'apoptose et la mort de type apoptotique, nécrotique, autophagique, et mécanismes apparentés.

L'invention concerne donc aussi l'utilisation des ADNc hANT1, hANT2, hANT3 pour induire/favoriser (ADNc hANT1 et/ou ADNc hANT3) ou au contraire inhiber (CDNA hANT2) la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et l'apoptose.

On cite en particulier leur application pour traiter un déficit d'apoptose, par exemple dans les différentes formes de cancer, les maladies auto-immunes, telles que lupus érythémateux disséminé, polyarthrites.

5

Dans d'autres applications, ces compositions sont utilisées pour traiter un excès d'apoptose comme par exemple les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington) et les ischémies cérébrales et cardiaques.

10

Par exemple, des siRNA de l'ANT1 ou l'ANT3, ou encore de l'ADNc de l'ANT2 pourront être utilisés pour inhiber la mort neuronale dans des situations d'ischémies ou de pathologies neurodégénératives ou encore pour inhiber la mort de cardiomyocytes dans des situations ischémiques, ou la mort d'hépatocytes (infections virales, intoxications médicamenteuses). Par exemple, des siRNA h-ANT2 et/ou des ADNc h-ANT1 ou h-ANT3 pourront être utilisés pour induire l'apoptose de cellules tumorales ou de lymphocytes auto-réactifs.

20

Lesdites compositions pharmaceutiques présentent également un grand intérêt pour le traitement des infections par HIV.

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se référant aux figures 1 à 6 qui représentent respectivement :

- 30 - Figure 1. Séquences complètes des ADNc codant pour les trois isoformes humaines de l'ANT isolés après RT/PCR à l'aide d'ARNs provenant de cellules 293T et HeLa.
- Figure 2. L'expression des isoformes hANT1 et hANT3 induisent l'apoptose . Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T, 24 heures après cotransfection d'1

µg de vecteur pIRES-2-eGFP avec 1 µg de vecteur pcDNA3.1-hANT. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives. B. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T, 24, 48 ou 72 heures après transfection avec 1 µg de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 µg de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives.. C. Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de noyaux hypoploïdes sur des cellules 293T 24, 48 ou 72h après transfection avec 1 µg de vecteur pIRES-eGFP ou 1 µg de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT.

- Figure 3. L'apoptose induite par l'expression de hANT1 et hANT3 est inhibée par ZVAD et Boc D mais pas par CsA. A. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T 48h après transfection avec 1 µg de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 µg de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT en présence ou en absence de 10 µM de CsA. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives. B. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T 48 heures après transfection avec 1 µg de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 µg de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT en présence ou en absence de 100 µM de ZVAD-fmk ou de 100 µM de Boc D. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives.

- Figure 4. L'expression de Bcl2 inhibe l'apoptose induite par l'expression des isoformes hANT1 et hANT3. Des cellules HeLa Neo et Bcl2 sont transfectées avec 1 µg de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 µg de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT et après 72 heures l'intensité

du marqueur CMXRos est analysée par cytométrie de flux sur les cellules GFP positives.

5 - Figure 5. Localisation subcellulaire des isoformes hANT1 et hANT2. Des cellules HeLa sont transfectées avec 1 µg de vecteur pcDNA3.1V5-hANT1 (A) ou avec 1 µg de vecteur pcDNA3.1V5-hANT2 (B) puis fixées avec du paraformaldehyde. La colocalisation des protéines de fusion hANT-V5 avec la protéine mitochondriale COX est réalisée par une immunodétection de fluorescence de 10 l'épitope V5 (fluorescence verte) et de la protéine COX (fluorescence rouge). L'image « merge » représente la superposition des fluorescences vertes et rouges montrant la colocalisation.

15 - Figure 6. Inhibition spécifique de l'expression des isoformes humaines 1 et 2 de l'ANT via l'utilisation de siRNA spécifiques.

(A) Des cellules HeLa sont co-transfectées avec d'une part un vecteur d'expresssion pcDNA3.1V5-hANT1 et d'autre part des siRNA spécifiques de l' hANT1 ou hANT2mut.

20 (B) Des Celules HeLa sont co-transfectées avec d'une part un vecteur d'expresssion pcDNA3.1V5-hANT2 et d'autre part des siRNA spécifiques de l' hANT2 ou hANT2mut.

Après 24 heures après transfection, les cellules sont 25 lysées et l'expression des isoformes de l'ANT est déterminée par Western-blot à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-V5.

30 **Cotransfections :** Des cellules HeLa sont cultivées en plaque 6 puits en DMEM/Glutamax-I complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Après 24 heures, les cellules sont transfectées en ajoutant 3 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen), 3 µg de siRNA et 1 µg de vecteur pcDNA3.1V5-hANT1 ou 2 dans du DMEM sans sérum (volume final 500 µl).

Les cellules sont rincées 6 heures après la transfection et maintenues en culture pendant 24, 48 ou 72 heures.

Préparations des extraits cellulaires et Western: Les
5 cellules sont resuspendues dans 100 µl de tampon de lyse
(25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton
X-100, cocktail d'inhibiteurs de proteases) et centrifugées
10 minutes à 13 000 rpm à 4°C. 10 µl du surnageant est
collecté pour réaliser un test Bradford. Les extraits sont
10 ensuite analysés en gel SDS-PAGE après dénaturation 3
minutes à 100 °C en présence de tampon SDS-Laemmli. Après
transfert les protéines sont révélées avec un anticorps
anti-V5 (1/5000, Invitrogen).

15 **Clonage des isoformes humaines d'ANT et réalisation de
vecteurs d'expression :** De l'ARN total de cellules 293T et
de cellules HeLa a été isolé (TRIZOL protocole) et utilisé
dans des expériences de reverse transcription/amplification
initiées avec une amorce de type oligodT. Des amorces
20 spécifiques des isoformes humaines de l'ANT (hANT1, hANT2
et hANT3) ont été synthétisées à partir des séquences
publiées dans GenBank afin d'amplifier spécifiquement
l'ADNc complet de chacune des isoformes (Table1). Ces
produits ont été ensuite sous-clonés dans le vecteur pGEM-T
25 après l'ajout d'un résidu d'Adénosine à leurs extrémités. La
séquence de chaque insert a été vérifiée (Figure 1). Les
ADNcs codant pour les trois isoformes ont ensuite été
clonés dans des vecteurs d'expression : pCDNA3.1 (version
+, Invitrogen) et pIRES-2-eGFP (Clontech). Afin de générer
30 des protéines de fusion avec l'épitope V5 correspondant aux
trois isoformes, une approche d'amplification (Table 2) a
permis de modifier les extrémités des ADNcs codant pour les
trois isoformes (mutation du codon STOP et également ajout
de séquences de reconnaissance d'enzymes de restrictions)

et de sous cloner ces produits dans le vecteur pcDNA3.1-V5 (versionA, Invitrogen). Les constructions finales ont été vérifiées par séquençage.

- 5 **Potentiel apoptotique des isoformes humaines de l'ANT** : Les expériences de transfection ont été réalisées sur des cellules 293T en utilisant le vecteur pIRES-2-GFP vide comme control ou les vecteurs pIRES-2-eGFP contenant les séquences des ADNcs codant pour les trois isoformes de
10 l'hANT. A un temps donné post-transfection les cellules ont été analysées par cytométrie de flux.

Les résultats montrent que l'expression des isoformes hANT1 et hANT3 conduit à une dissipation du potentiel
15 mitochondrial déclenchant ainsi l'apoptose alors que l'expression de l'isoforme hANT2 n'affecte pas l'intégrité mitochondriale (Figure 2).

En utilisant une approche expérimentale similaire nous
20 démontrons que l'apoptose liée à l'expression des isoformes hANT1 et hANT3 est inhibée par des inhibiteurs des caspases (ZVAD et Boc D) (figure 3A) mais pas par la Cyclosporine A (CsA) (Figure 3B).

25 Nous démontrons également, en utilisant des cellules HeLa surexprimant la protéine Bcl2 que cette dernière est capable d'inhiber l'apoptose induite par les isoformes hANT1 et hANT2 figure 4)

30 **Localisation subcellulaire des isoformes hANT1 et hANT2** : Après transfection de cellules HeLa avec des constructions codant pour les protéines de fusion hANT1-V5 et hANT2-V5 nous avons réalisé un immunomarquage afin de déterminer la localisation subcellulaire de hANT1 et hANT2. L'analyse de

la localisation du signal obtenu avec un anticorps anti-V5 et le signal obtenu avec un anticorps dirigé contre COX (une protéine mitochondriale) met en évidence une localisation mitochondriale des isoformes hANT1 et2 (figure 5).

Duplex ARNi des isoformes humaines de l'ANT

Préparation des ARNi. Les siRNA double-brins correspondant aux séquences d'ADNc ANT1 humaine (AAACAGATCAGTGCTGAGAAG, nucléotides 127-147), ANT2 humaine (AAGCAGATCACTGCAGATAAG, nucléotides 127-147), Ant2 humaine contenant quatre mutations (AAGCGGATCGCTACAAATAAG, nucléotides 127-147) et Ant3 humaine (AAGGGCATCGTGGAAGTGCATT, nucléotides 154-174) ont été conçues selon les recommandations de Elbashir et al. (2001). Les duplex ont été réalisés par Proligo (France).

hANT1 (127-147)

5 Séquence d'ADN: 5'-aaacagatcagtgcctgagaag-3' (SEQ ID N°7)
 Duplex ARNi: 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3' (SEQ ID N°8).
 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3' (SEQ ID N°9)

hANT2 (127-147)

10 Séquence ADN: 5'-aagcagatcactgcagataag-3' (SEQ ID N°10)
 Duplex ARNi: 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3' (SEQ ID N°11)
 5'-cuuauucgagugaucugcdTdT-3' (SEQ ID N°12)

hANT2mut(127-147)

15 Séquence ADN: 5'-aagcggatcgctacaaataag-3' (SEQ ID N°13)
 Duplex ARNi: 5'-gcggaucgcuacaaauaagdTdT-3' (SEQ ID N°14)
 5'-cuuauuuguagcgauccgcdTdT-3' (SEQ ID N°15)

hANT3 (154-174)

20 Séquence ADN: 5'-aagggcatcgtggactgcatt-3' (SEQ ID N°16)
 Duplex ARNi: 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3' (SEQ ID N°17)
 25 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3' (SEQ ID N°18)

Dans les tableaux ci-après, on rapporte respectivement les séquences des amorces utilisées :

- 30 - Tableau 1 : lors des expériences de RT/PCR afin de cloner l'ADNc codant pour les trois isoformes humaines de l'ANT.
- Tableau 2 : pour la construction des vecteurs d'expression contenant les ADNcs codant pour les protéines de fusion hANT-V5.

	Amorce sens	Amorce antisens
hANT1 (SEQ ID N°22 et 23)	5'ATGGGTGATCACGCTTGGAGCTTCCTAAAG3'	5'TTAGACATATTTTGTGATCTCATCATACAA3'
hANT2 (SEQ ID N°24 et 25)	5'ATGACAGATGCCGCTGTGTCCTTCGCCAAG3'	5'TTATGTGTACTTCTTGATTTCATCATACAA3'
hANT3 (SEQ ID N°26 et 27)	5'ATGACGGAAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA3'	5'TTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAG3'

Table 1

	Amorce sens		Amorce antisens
hANT1	5'TAAGGTACCATGGGTGATCACGCTTGGG3'	(SEQ ID N°29 et 29)	5'ATCTCGAGGACATATTTTGGATCTC3'
hANT2	5'TAAGGTACCATGACAGATGCCGCTGTGT3'	(SEQ ID N°30 et 31)	5'ATCTCGAGTGTACTTCTTGATTTTC3'
hANT3	5'TAAGGTACCATGACGGAACAGGCCATCT3'	(SEQ ID N°32 et 33)	5'ATCTCGTGGATCACCTTCTTGAGCTC3'

Table 2

Références :

Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon, G. J. (2001).
Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA.
5 *Nat Rev Genet*, **2**, 110-119.

Sharp, P.A. (2001). RNA interference-2001. *Genes Dev.* **15**,
485-490.

10 Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A.,
Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide
RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
15 *Nature*, **411**, 494-498.

REVENDICATIONS

1/ ARNi capables d'inhiber sélectivement l'expression d'une
5 isoforme de l'ANT, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un
duplex d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un
fragment de l'ARNm codant pour ledit isoforme de l'ANT.

2/ ARNi selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
10 s'agit d'un siRNA de 18 à 25 nucléotides, plus
particulièrement de 21 nucléotides.

3/ ARNi selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il
15 présente la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

4/ Construction contenant au moins un ARNi selon l'une
quelconque des revendications 1 à 3, ou des séquences d'ADN
codant pour chacun des brins de ces ARNi.

20 5/ Construction selon la revendication 4, caractérisée en
ce que l'ARNi est associé à un vecteur facilitant son
administration, son passage au travers de membranes, tissus
ou de téguments biologiques, notamment membranes
cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes
25 nucléaires, la peau, les muqueuses, les parois
endothéliales, la barrière hémato-encéphalique, ainsi que
sa biodisponibilité, sa stabilité et sa
pharmacodistribution tel qu'un peptide, un liposome, des
nanoparticules (nanosphères, nanotubes), un oligomère non
30 naturel tels que des oligomères d'urée.

6/ Construction selon la revendication 4, caractérisée en
ce qu'il s'agit de vecteurs permettant le transfert

d'acides nucléiques, tels que rétrovirus, transposons, adénovirus, plasmides.

5 7/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un ARNi selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou une construction selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10

8/ Compositions pharmaceutiques, selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme injectable, ou administrable par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

15

9/ ARNi selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ou compositions pharmaceutiques selon la revendication 7 ou 8, caractérisés en ce qu'ils ont la capacité de réguler
20 (induire ou inhiber) la perméabilisation des membranes mitochondriales et la mort cellulaire de type apoptotique, nécrotique, autophagique et mécanismes apparentés.

Figure 1**hANT 1 sequence (SEQ ID N°19) :**

atgggtgatcacgcttggagcttcctaaaggacttcctggccggggcggtcgccgctgccgt
ctccaagaccgcggtcgccccatcgagaggggtcaaactgctgctgcaggtccagcatgcca
gcaaacagatcagtgctgagaagcagtacaaagggatcattgattgtgtggtgagaatccct
aaggagcagggcttcctctccttctggaggggtaacctggccaacgtgatccgttacttccc
cacccaagctctcaacttcgccttcaaggacaagtacaagcagctcttcttaggggggtgtgg
atcggcataagcagttctggcgctactttgctggtaacctggcgctccggtggggccgctggg
gccacctccctttgctttgtctaccgctggactttgctaggaccaggttggctgctgatgt
gggcaggcgcgcccagcgtgagttccatgggtctgggcgactgtatcatcaagatcttcaagt
ctgatggcctgagggggctctaccagggtttcaacgtctctgtccaaggcatcattatctat
agagctgcctacttcggagttctatgatactgccaaggggatgctgcctgaccccaagaacgt
gcacatTTTTgtgagctggatgattgccagagtgtagcggcagtcgcagggctgctgtcct
àccctttgacactgttcgtcgtagaatgatgatgcagtcgggccggaaggggccgatatt
atgtacacggggacagttgactgctggaggaagattgcaaaagacgaaggagccaaggcctt
cttcaaagggtgcttgggtccaatgtgctgagaggcatgggcggtgcttttgtattgggtgtgt
atgatgagatcaaaaaatatgtctaa

hANT 2 sequence (SEQ ID N°20) :

atgacagatgccgctgtgtccttcgccaaggacttcctggcaggtggagtgccgcagccat
ctccaagacggcggttagcgcccatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtgcagcatgcca
gcaagcagatcactgcagataagcaatacaaaggcattatagactgcgtgggtccgtattccc
aaggagcagggagttctgtccttctggcgcggttaacctggccaatgtcatcagatacttccc
cacccaggctcttaacttcgccttcaaagataaatacaagcagatcttcctgggtgggtgtgg
acaagagaacccagttttggcgctactttgcagggaaatctggcatcggggtgggtgccgcagg
gccacatccctgtgttttgtgtaccctcttgattttgcccgtaaccgtctagcagctgatgt
gggtaaagctggagctgaaagggaattccgaggcctcgggtgactgcctgggttaagatctaca
aatctgatgggattaagggcctgtaccaaggccttaacgtgtctgtgcagggtattatcatc
taccgagccgcctacttcggtatctatgacactgcaaagggaatgcttccggatccaagaa
cactcacatcgatcagctggatgatcgcacagactgtcactgctgttgccgggttgactt

cctatccatttgacaccgttcgccgccgcatgatgatgcagtcagggcgcaaaggaactgac
atcatgtacacaggcacgcttgactgctggcgggaagattgctcgtgatgaaggaggcaaagc
ttttttcaaggggtgcatgggtccaatgtttctcagaggcatgggtgggtgcttttgtgcttgtct
tgtatgatgaaatcaagaagtacacataa

hANT 3 sequence (SEQ ID N°21) :

atgacggaacaggccatctccttcgccaaagacttcttggccggaggcatcgccgccgcat
ctccaagacggccgtggctccgatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtccagcacgcc
gcaagcagatcgccgccgacaagcagtacaagggcatcgtggactgcattgtccgcaccccc
aaggagcagggcgctgctgtccttctggaggggcaaccttgccaacgtcattcgctacttccc
cactcaagccctcaacttcgccttcaaggataagtacaagcagatcttcctggggggcgctgg
acaagcacacgcagttctggaggtactttgcggggcaacctggcctccggcggtgcggccggc
gcgacctccctctgcttcgtgtacctcgctggatcttcgccagaacctgcctggcagcggacgt
gggaaagtacggcacagagcgcgagttccgaggcctgggagactgcctggtgaagatcacca
agtccgacggcatccggggcctgtaccagggttcagtgtctccgtgcagggcatcatcatc
taccgggcggcctacttcggcgtgtacgatacggccaagggcatgctccccgaccccaagaa
cacgcacatcgtgggtgagctggatgatcgcgagaccgtgacggccgtggccggcggtggtgt
cctaccttctcgacacggtgcggcgggcgcatgatgatgcagtcggggcgcaaaggagctgac
atcatgtacacgggcaccgtcgactgttggaggaagatcttcagagatgaggggggcaaggc
cttcttcaaggggtgcgtgggtccaacgtcctgcggggcatggggggcgcccttcgtgctgggtcc
tgtacgacgagctcaagaaggtgatctaa

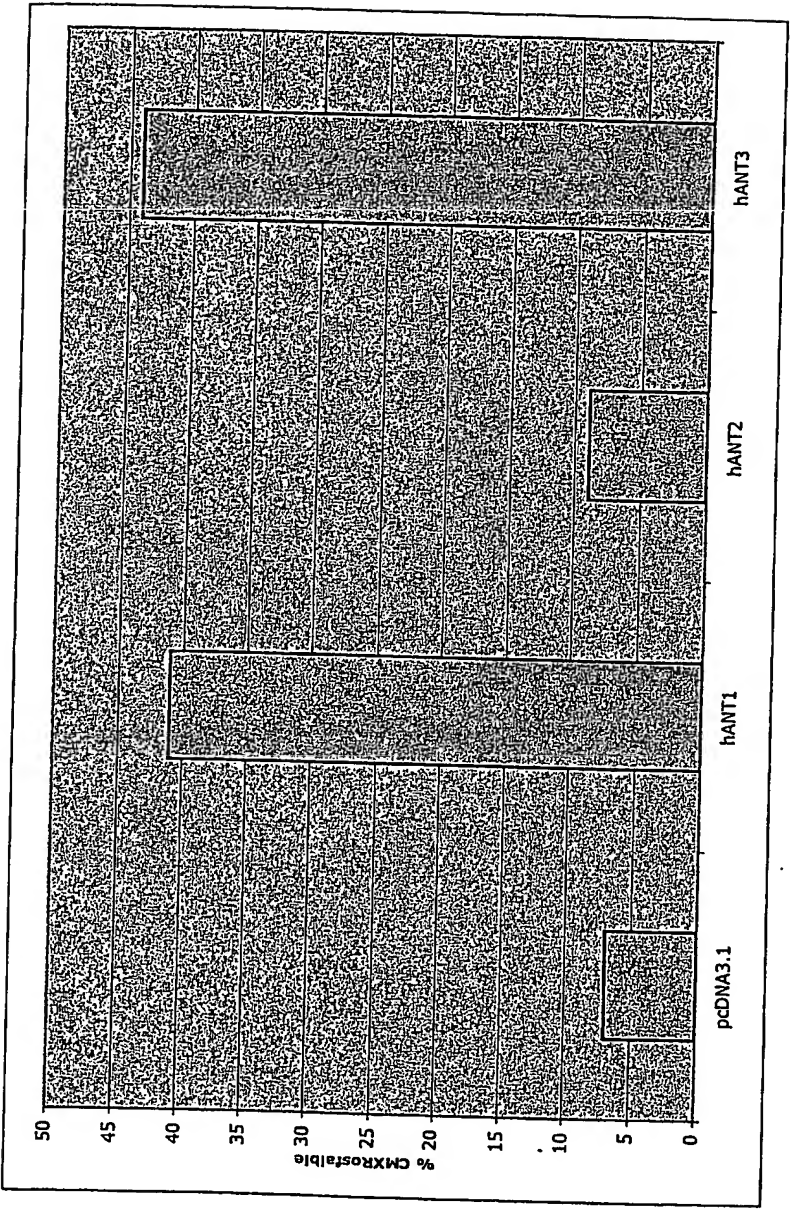


Figure 2A

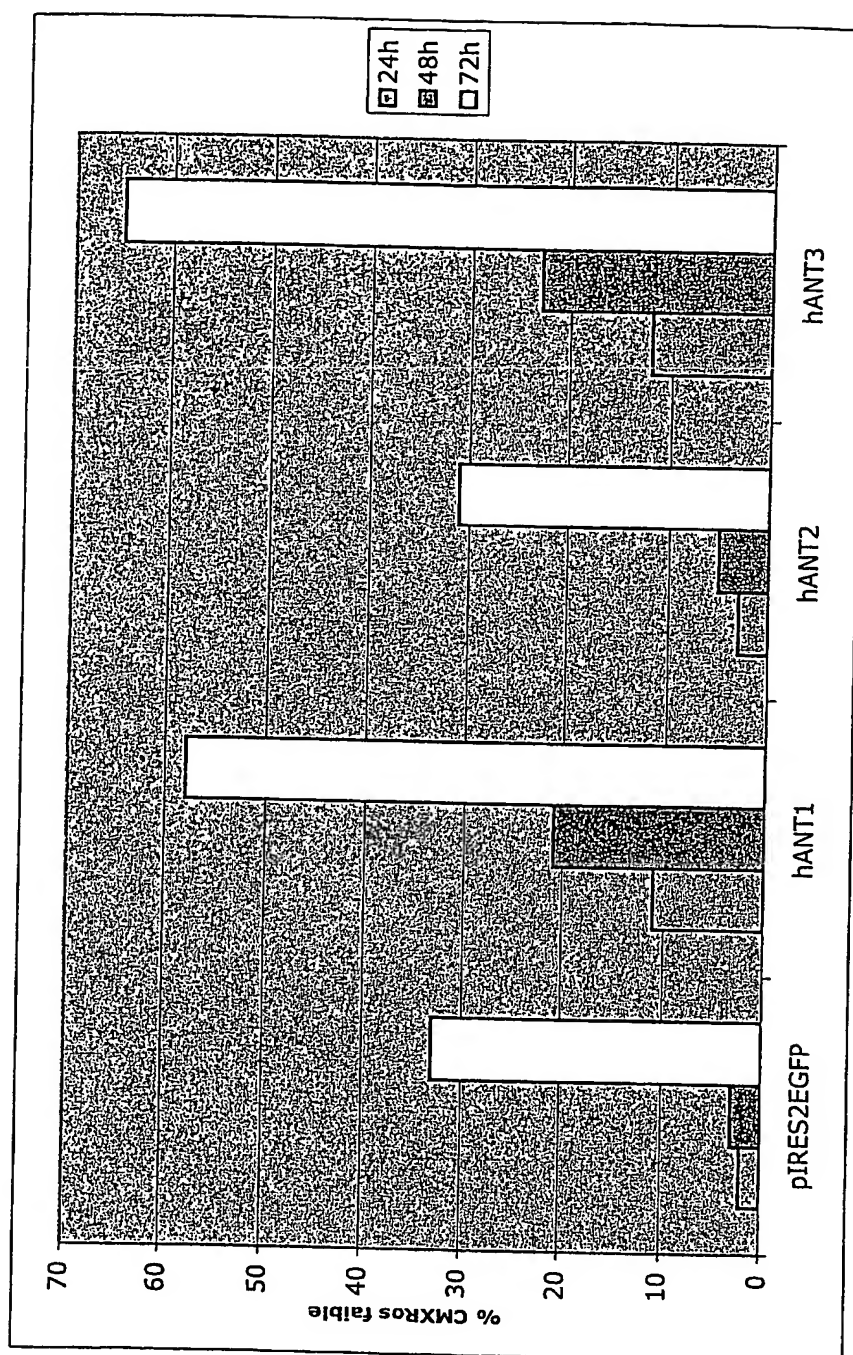


Figure 2B

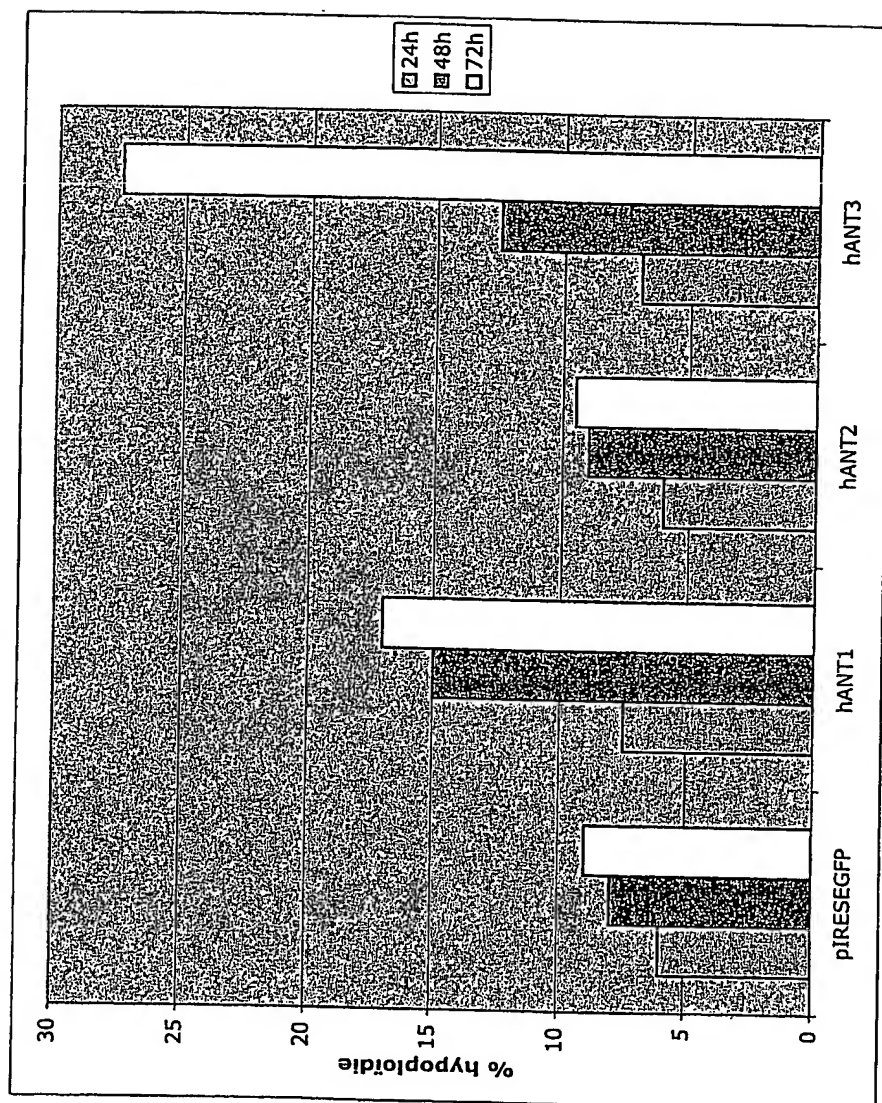


Figure 2C

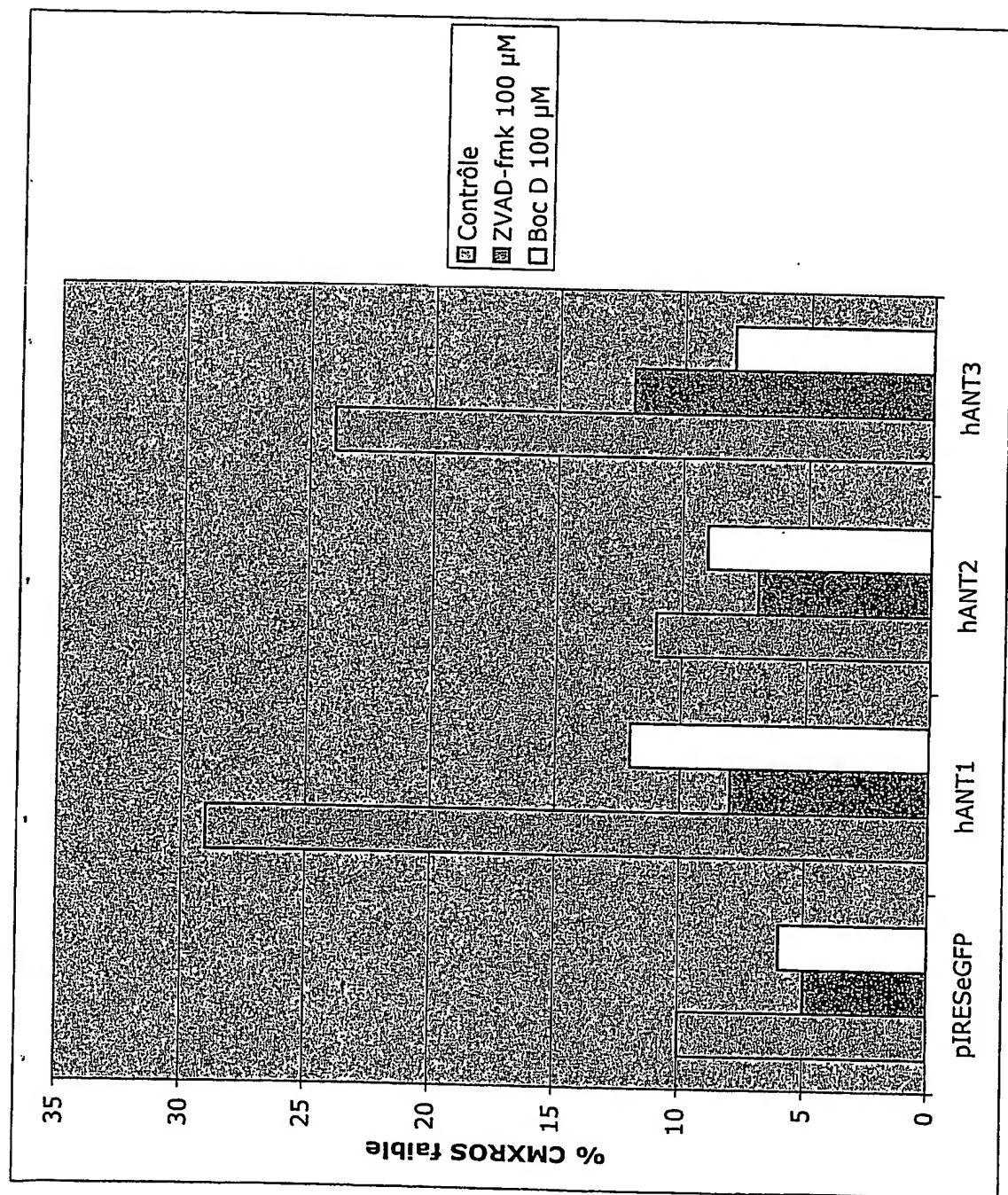


Figure 3A

7/11

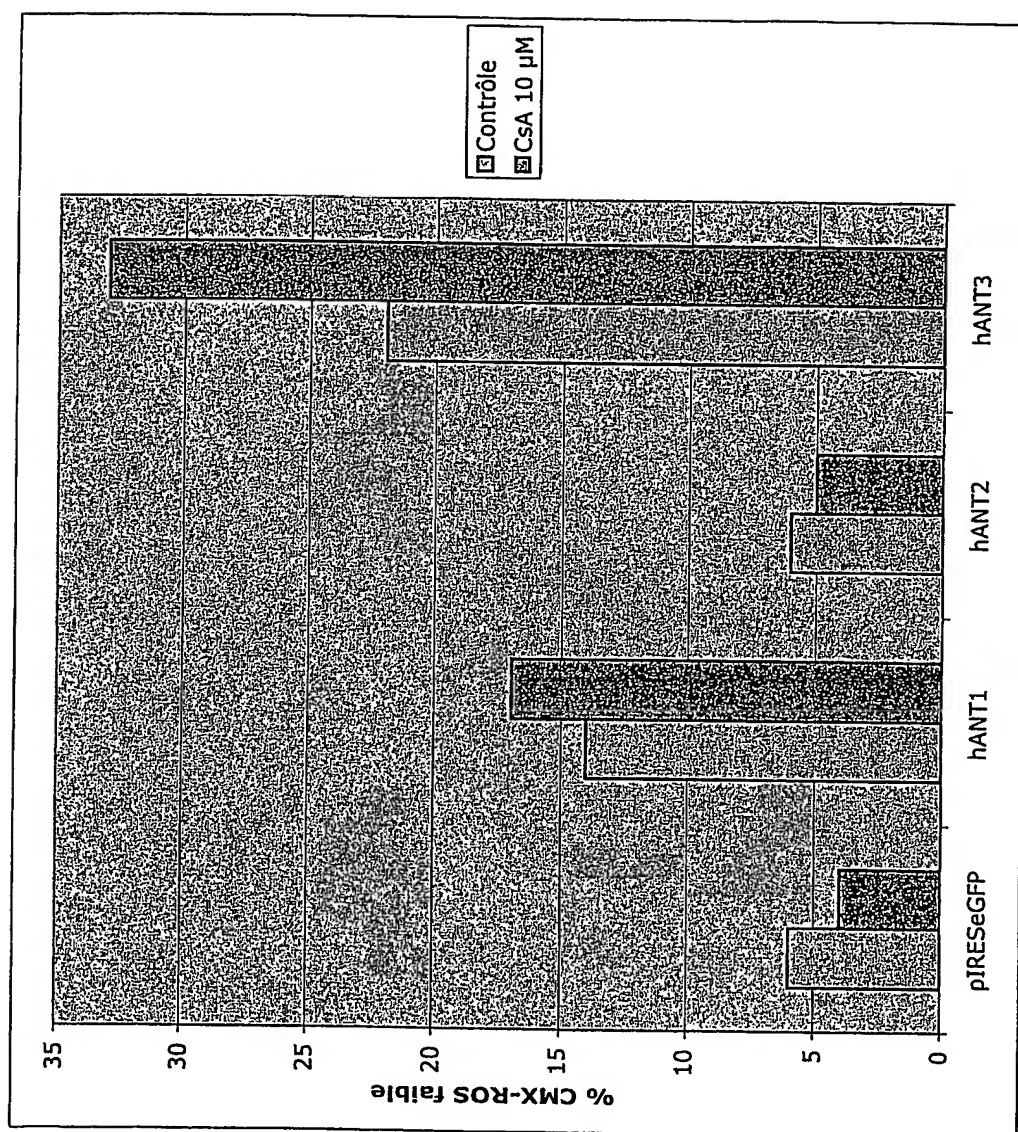


Figure 3B

8/11

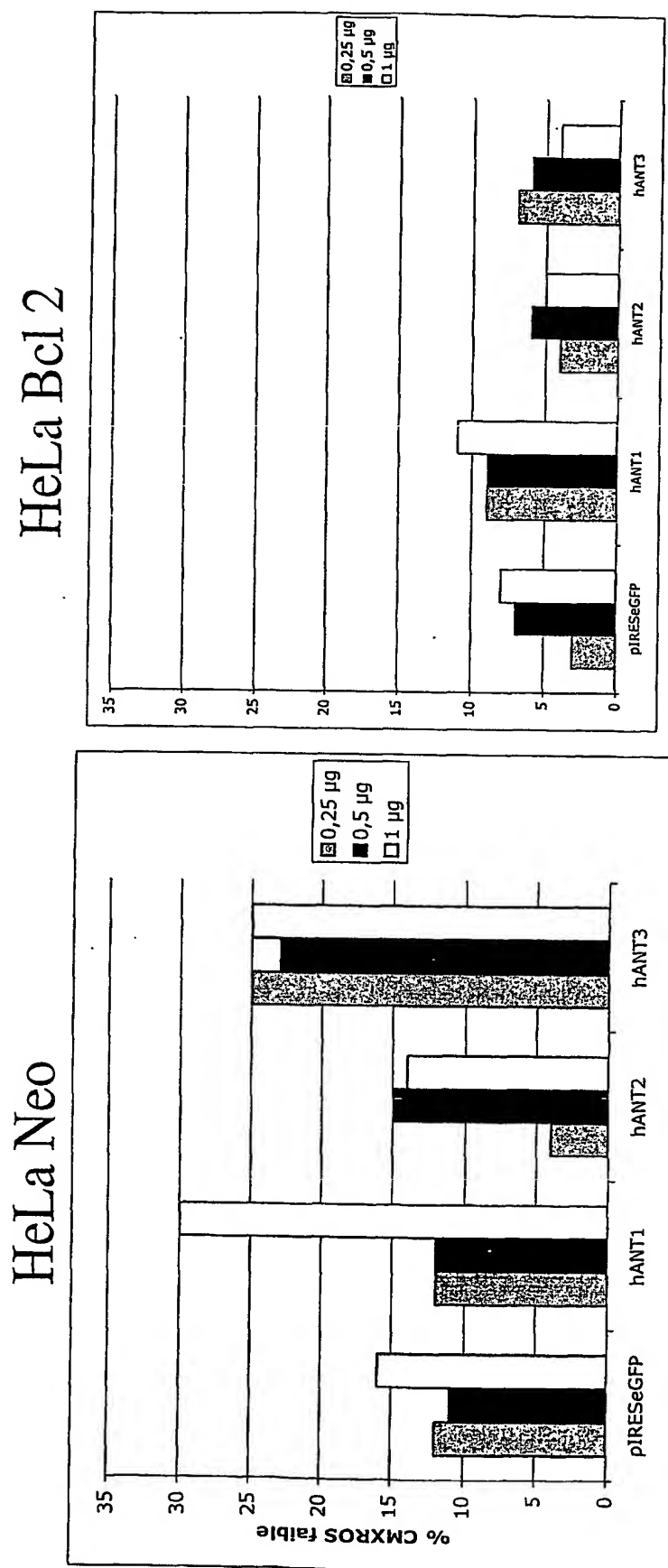


Figure 4

9/11

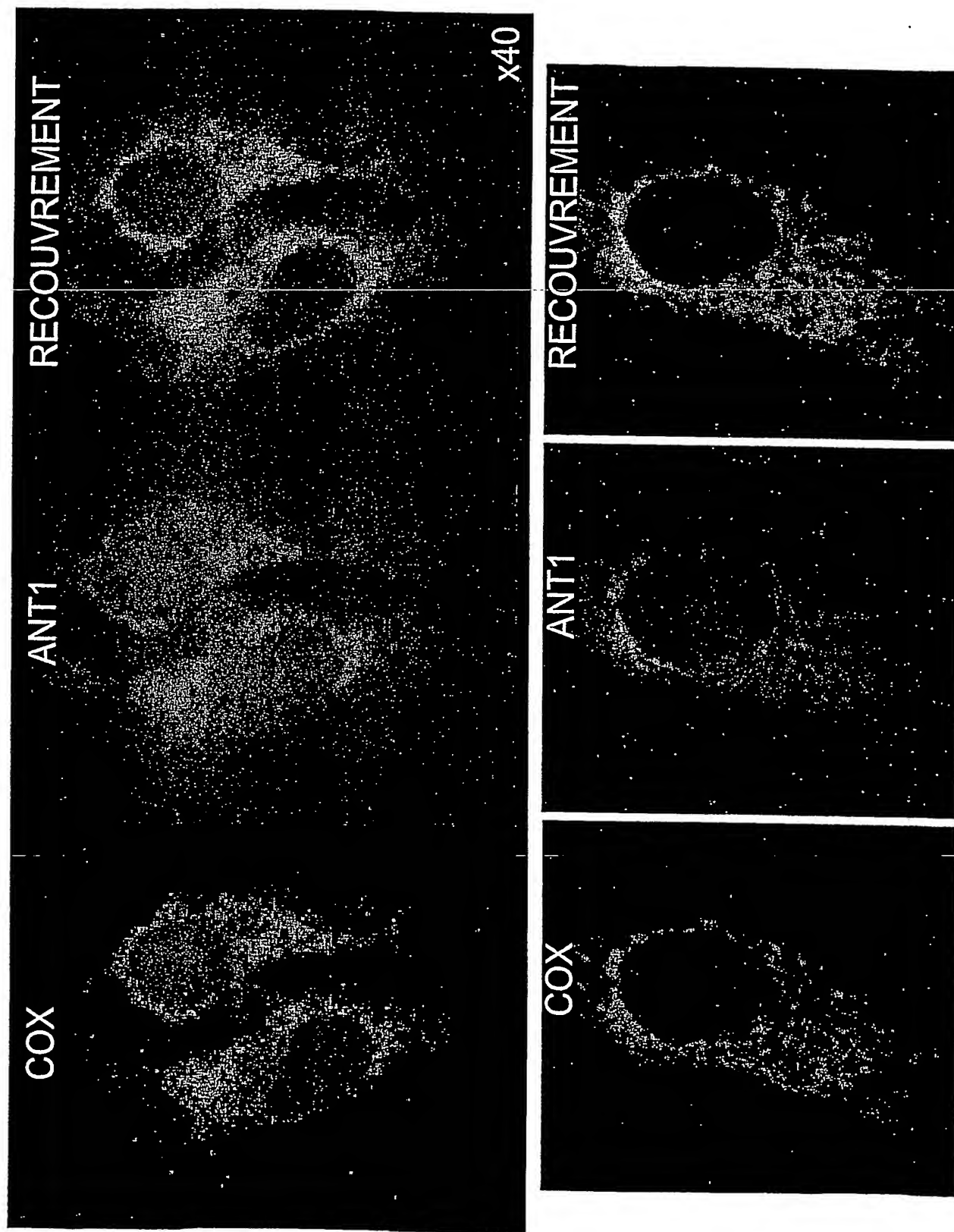


Figure 5A

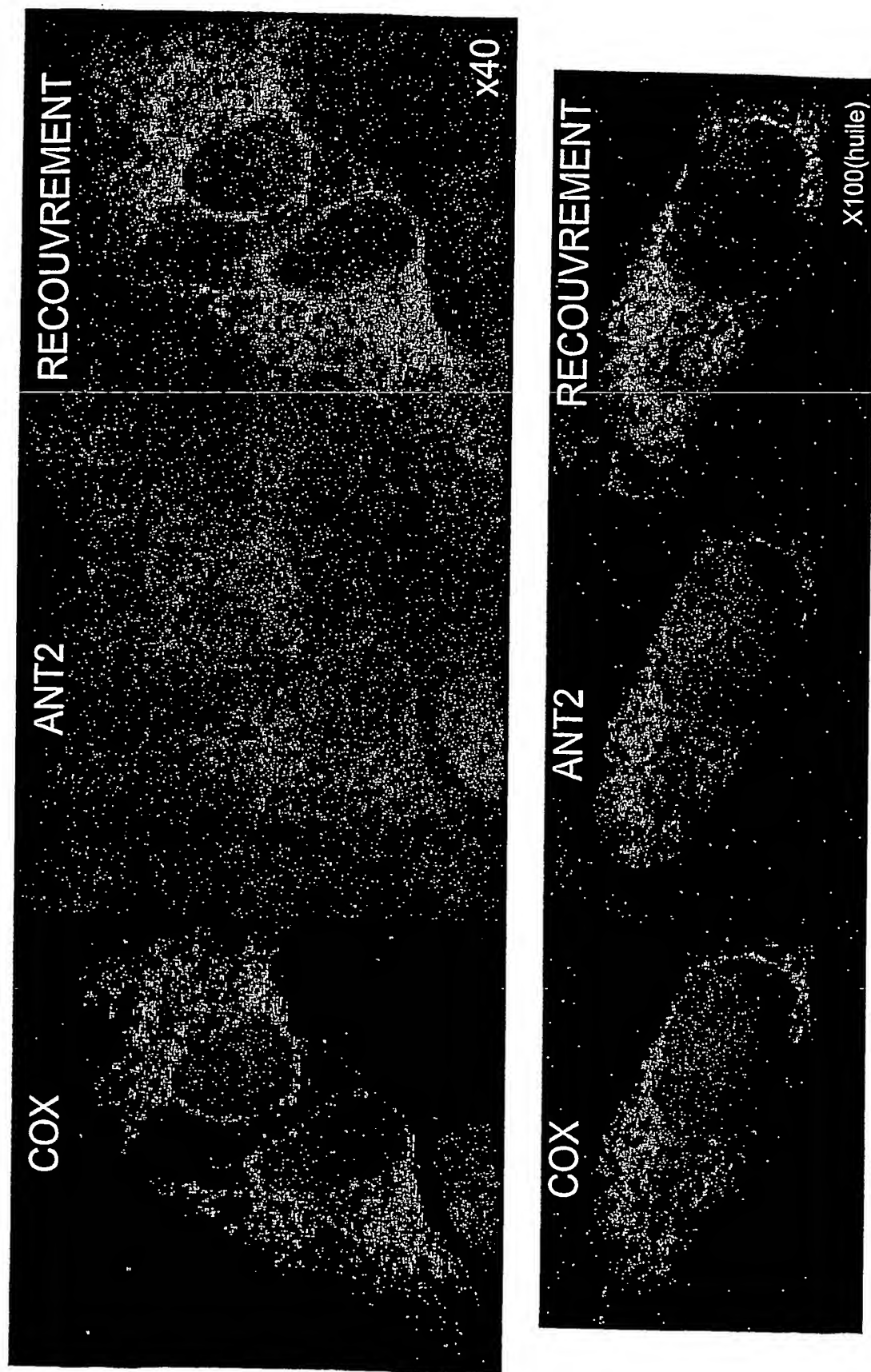


Figure 5B

Interférence à ARN sur des cellules transfectées par hANT1 et 2

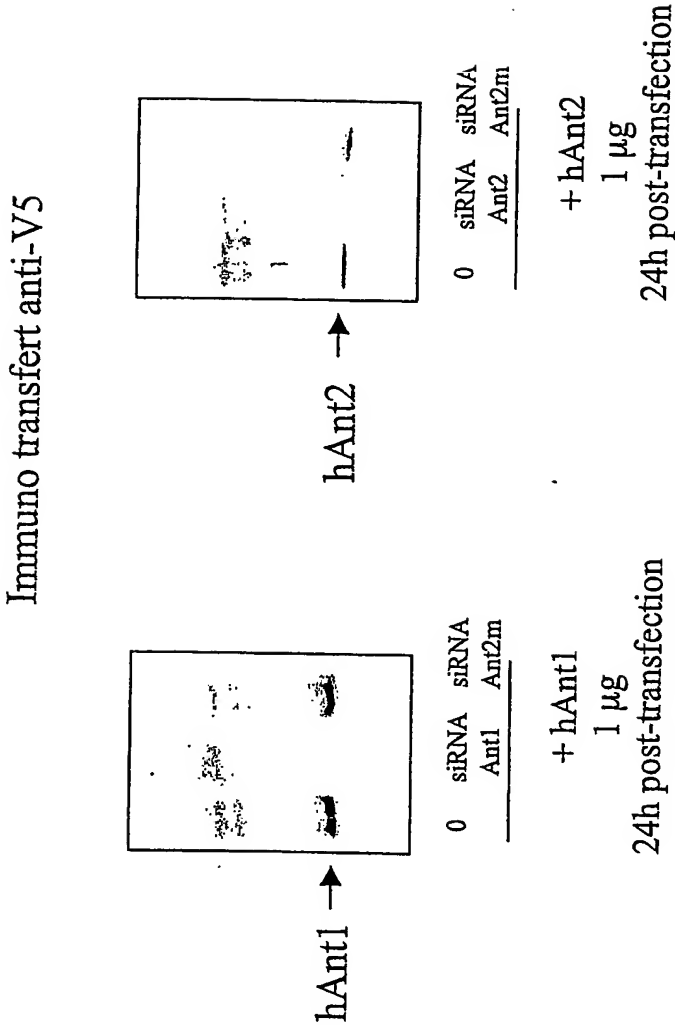


Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> THERAPTOSIS

<120> MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES
HUMAINES DE L'ANT

<130> 60889

<140> FR 03 00622

<141> 2004-01-21

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> desoxythymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> desoxythymidine

<400> 1

acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 2
cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 3
gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<400> 4

cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 5

gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 6

aaugcagucc acgaugccn n

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

aaacagatca gtgctgagaa g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

aagcagatca ctgcagataa g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

aagcggatcg ctacaaataa g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

aagggcatcg tggactgcat t

21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 11

acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 12

cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 13

gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 14

cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 15

gcggaucgcu acaaaauagn n

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 16

cuuauuugua gcgauccgcn n

21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 17

gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 18

aaugcagucc acgaugcccn n

21

<210> 19

<211> 894

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

atgggtgatc acgcttggag cttcctaaag gacttcctgg ccggggcggt cgccgctgcc 60
gtctccaaga ccgcggctgc ccccatcgag aggggtcaaac tgctgctgca ggtccagcat 120
gccagcaaac agatcagtgc tgagaagcag taaaaggga tcattgattg tgtggtgaga 180
atccctaagg agcagggcct cctctccttc tggaggggta acctggccaa cgtgatccgt 240
tacttcccca cccaagctct caacttcgcc ttcaaggaca agtacaagca gctcttcta 300
gggggtgtgg atcggcataa gcagttctgg cgctactttg ctggtaacct ggcgtccggt 360
ggggccgctg gggccacctc ctttgcttt gtctaccgc tggactttgc taggaccagg 420
ttggctgctg atgtgggcag gcgcgcccag cgtgagttcc atggcttggg cgactgtatc 480
atcaagatct tcaagtctga tggcctgagg gggctctacc agggtttaa cgtctctgtc 540
caaggcatca ttatctatag agctgcctac ttcggagtct atgatactgc caaggggatg 600
ctgcctgacc ccaagaacgt gcacatttt gtgagctgga tgattgcca gagtgtgacg 660
gcagtcgcag ggctgctgtc ctacccttt gacactgttc gtcgtagaat gatgatgcag 720

tccggccgga aaggggccga tattatgtac acggggacag ttgactgctg gaggaagatt 780
gcaaaagacg aaggagccaa ggccttcttc aaaggtgcct ggtccaatgt gctgagaggc 840
atgggcggtg cttttgtatt ggtgttgtat gatgagatca aaaaatatgt ctaa 894

<210> 20

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

atgacagatg ccgctgtgtc cttcgccaag gacttcctgg caggtggagt ggccgcagcc 60
atctccaaga cggcggtagc gcccatcgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtgcagcat 120
gccagcaagc agatcactgc agataagcaa tacaaggca ttatagactg cgtggtccgt 180
attcccaagg agcaggaggt tctgtccttc tggcgcggta acctggccaa tgatcatcaga 240
tacttccca cccaggctct taacttcgcc ttcaaagata aatacaagca gatcttctg 300
ggtggtgtgg acaagagaac ccagttttgg cgctactttg cagggaatct ggcatcgggt 360
ggtgccgcag gggccacatc cctgtgtttt gtgtaccctc ttgattttgc ccgtaccctg 420
ctagcagctg atgtgggtaa agctggagct gaaagggaat tccgaggcct cggtgactgc 480
ctggtaaga tctacaaatc tgatgggatt aagggcctgt accaaggctt taacgtgtct 540
gtgcagggta ttatcatcta ccgagccgcc tacttcggta tctatgacac tgcaaaggga 600
atgcttccgg atccaagaa cactcacatc gtcatcagct ggatgatcgc acagactgtc 660
actgctgttg ccgggttgac ttctatcca ttgacaccg ttcgccgccg catgatgatg 720
cagtcagggc gcaaaggaa tgacatcatg tacacaggca cgcttgactg ctggcggaag 780
attgctcgtg atgaaggagg caaagctttt ttcaagggtg catggtccaa tgttctcaga 840

ggcatgggtg gtgcttttgt gcttgtcttg tatgatgaaa tcaagaagta cacataa 897

<210> 21

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

atgacggaac aggccatctc cttcgccaaa gacttcttgg ccggaggcat cgccgccgcc 60
atctcaaga cggccgtggc tccgatcgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtccagcac 120
gccagcaagc agatgccgc cgacaagcag tacaaggga tcgtggactg cattgtccgc 180
atcccaagg agcagggcgt gctgtccttc tggaggggca acctgccaa cgtcattcgc 240
tacttccca ctcaagccct caactcgcc ttcaaggata agtacaagca gatcttctg 300
gggggcgtgg acaagcacac gcagtcttgg aggtactttg cgggcaacct ggcctccggc 360
ggtgcggccg ggcgcacct cctctgcttc gtgtaccgc tggatttcgc cagaaccgc 420
ctggcagcgg acgtgggaaa gtcaggcaca gagcgcgagt tccgaggcct gggagactgc 480
ctggtgaaga tcaccaagtc cgacggcatc cggggcctgt accagggtt cagtgtctcc 540
gtgcagggca tcatcatcta ccgggcggcc tacttcggcg tgtacgatac ggccaagggc 600
atgctccccg accccaagaa cacgcacatc gtggtgagct ggatgatgc gcagaccgtg 660
acggccgtgg ccggcgtggt gtctacccc ttgcacacgg tgcggcggcg catgatgatg 720
cagtccgggc gcaaaggagc tgacatcatg tacacgggca ccgtcgactg ttggaggaag 780
atcttcagag atgagggggg caaggccttc ttcaagggtg cgtggtccaa cgtcctgcgg 840
ggcatggggg ggccttcgt gctggtcctg tacgacgagc tcaagaaggt gatctaa 897

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

atgggtgatc acgcttgag cttcctaaag

30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 23

ttagacatat ttttgatct catcatacaa

30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 24

atgacagatg ccgctgtgtc cttcgccaag

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

ttatgtgtac ttcttgattt catcatacaa

30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 26

atgacggaac aggccatctc cttcgccaaa

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 27

ttagatcacc ttcttgagct cgtcgtacag

30

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

taaggtacca tgggtgatca cgcttgga

28

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 29

atctcgagga catatTTTT gatctc

26

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 30

taaggtacca tgacagatgc cgctgtgt

28

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

atctcgagtg tgtacttctt gatttc

26

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 32

taaggtacca tgacggaaca ggccatct

28

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 33

atctcgtgga tcaccttctt gagctc

26

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/435 C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FAURE-VIGNY HELENE ET AL: "Expression of oxidative phosphorylation genes in renal tumors and tumoral cell lines" MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 16, no. 3, 1996, pages 165-172, XP009022330 ISSN: 0899-1987 page 168, right-hand column, paragraph 2 page 171, left-hand column, last paragraph figure 3</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2004

Date of mailing of the international search report

29/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BELZACQ ANNE-SOPHIE ET AL: "The adenine nucleotide translocator in apoptosis." BIOCHIMIE (PARIS), vol. 84, no. 2-3, pages 167-176, XP002265382 ISSN: 0300-9084 page 173, left-hand column, paragraph 2 -page 174, left-hand column, paragraph 1 ---	1-8
Y	BRUMMELKAMP T R ET AL: "STABLE SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY VIRUS-MEDIATED RNA INTERFERENCE" CANCER CELL, XX, US, vol. 2, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 figures 1,2 page 243, right-hand column, last line -page 244, left-hand column, line 2 page 246, left-hand column, last paragraph -page 246, right-hand column, line 41 ---	1-8
Y	SUI GUANGCHAO ET AL: "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 99, no. 8, 16 April 2002 (2002-04-16), pages 5515-5520, XP002964701 ISSN: 0027-8424 page 5515, left-hand column, line 19-24 page 5515, right-hand column, line 8-40 page 5516, left-hand column, last paragraph -page 5516, right-hand column, line 3 page 5516, right-hand column, last paragraph -page 5517, left-hand column page 5520, right-hand column, paragraph 1 figure 1; table 1 --- -/--	1-8

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 24 May 2001 (2001-05-24), pages 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836 cited in the application page 495, left-hand column, paragraph 2 -page 495, right-hand column, paragraph 1 page 496, left-hand column, paragraph 2 page 497, right-hand column, paragraphs 2,3 figure 1</p>	1-8
Y	<p>--- DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; Nucleic acids research supplement (2001), 2001 FUTAMI ET AL.: "Induction of Apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2" retrieved from MEDLINE Database accession no. 12903200 XP002264267 the whole document</p>	1-9
Y	<p>--- HALESTRAP ANDREW P ET AL: "The permeability transition pore complex: Another view." BIOCHIMIE (PARIS), vol. 84, no. 2-3, pages 153-166, XP002284573 ISSN: 0300-9084 page 157, left-hand column, last paragraph -page 158, left-hand column, paragraph 1 page 159, left-hand column, paragraph 2 -page 160, right-hand column, paragraph 1 page 162, left-hand column, line 14-16 page 162, right-hand column, last paragraph page 164, left-hand column, line 5-10</p>	9
	<p>--- -/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>VIEIRA H L A ET AL: "Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: Impact of the adenine nucleotide translocator" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 7, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1146-1154, XP009032249 ISSN: 1350-9047 page 1148, left-hand column, last paragraph -page 1149, left-hand column, paragraph 1 page 1150, left-hand column, last paragraph -page 1150, right-hand column, line 16 figures 1,3</p>	9
A	<p>----- BRENNER C ET AL: "Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator" ONCOGENE 20 JAN 2000 UNITED KINGDOM, vol. 19, no. 3, 20 January 2000 (2000-01-20), pages 329-336, XP002265383 ISSN: 0950-9232 -----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000127

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K14/435 C12N15/11

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FAURE-VIGNY HELENE ET AL: "Expression of oxidative phosphorylation genes in renal tumors and tumoral cell lines" MOLECULAR CARCINOGENESIS, vol. 16, no. 3, 1996, pages 165-172, XP009022330 ISSN: 0899-1987 page 168, colonne de droite, alinéa 2 page 171, colonne de gauche, dernier alinéa figure 3 --- -/-	1-8

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/06/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seroz, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000127

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>BELZACQ ANNE-SOPHIE ET AL: "The adenine nucleotide translocator in apoptosis." BIOCHIMIE (PARIS), vol. 84, no. 2-3, pages 167-176, XP002265382 ISSN: 0300-9084 page 173, colonne de gauche, alinéa 2 -page 174, colonne de gauche, alinéa 1</p>	1-8
Y	<p>BRUMMELKAMP T R ET AL: "STABLE SUPPRESSION OF TUMORIGENICITY BY VIRUS-MEDIATED RNA INTERFERENCE" CANCER CELL, XX, US, vol. 2, no. 3, septembre 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108 figures 1,2 page 243, colonne de droite, dernière ligne -page 244, colonne de gauche, ligne 2 page 246, colonne de gauche, dernier alinéa -page 246, colonne de droite, ligne 41</p>	1-8
Y	<p>SUI GUANGCHAO ET AL: "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 99, no. 8, 16 avril 2002 (2002-04-16), pages 5515-5520, XP002964701 ISSN: 0027-8424 page 5515, colonne de gauche, ligne 19-24 page 5515, colonne de droite, ligne 8-40 page 5516, colonne de gauche, dernier alinéa -page 5516, colonne de droite, ligne 3 page 5516, colonne de droite, dernier alinéa -page 5517, colonne de gauche page 5520, colonne de droite, alinéa 1 figure 1; tableau 1</p>	1-8

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000127

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 24 mai 2001 (2001-05-24), pages 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836 cité dans la demande page 495, colonne de gauche, alinéa 2 -page 495, colonne de droite, alinéa 1 page 496, colonne de gauche, alinéa 2 page 497, colonne de droite, alinéas 2,3 figure 1</p>	1-8
Y	<p>----- DATABASE MEDLINE 'en ligne! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; Nucleic acids research supplement (2001), 2001 FUTAMI ET AL.: "Induction of Apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2" retrieved from MEDLINE Database accession no. 12903200 XP002264267 le document en entier</p>	1-9
Y	<p>----- HALESTRAP ANDREW P ET AL: "The permeability transition pore complex: Another view." BIOCHIMIE (PARIS), vol. 84, no. 2-3, pages 153-166, XP002284573 ISSN: 0300-9084 page 157, colonne de gauche, dernier alinéa -page 158, colonne de gauche, alinéa 1 page 159, colonne de gauche, alinéa 2 -page 160, colonne de droite, alinéa 1 page 162, colonne de gauche, ligne 14-16 page 162, colonne de droite, dernier alinéa page 164, colonne de gauche, ligne 5-10</p>	9
	<p>----- -/--</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000127

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>VIEIRA H L A ET AL: "Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: Impact of the adenine nucleotide translocator" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 7, no. 12, décembre 2000 (2000-12), pages 1146-1154, XP009032249 ISSN: 1350-9047 page 1148, colonne de gauche, dernier alinéa -page 1149, colonne de gauche, alinéa 1 page 1150, colonne de gauche, dernier alinéa -page 1150, colonne de droite, ligne 16 figures 1,3</p>	9
A	<p>-----</p> <p>BRENNER C ET AL: "Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator" ONCOGENE 20 JAN 2000 UNITED KINGDOM, vol. 19, no. 3, 20 janvier 2000 (2000-01-20), pages 329-336, XP002265383 ISSN: 0950-9232</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2004/000127

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:

a. Nature de l'élément

☒

un listage de la ou des séquences

☒

un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences

b. Type de support

☐

sur papier sous forme écrite

☐

sur support électronique sous forme déchiffrable par ordinateur

c. Moment du dépôt ou de la remise

☐

contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée

☐

déposé(s) avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur

☐

remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche

2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.

3. Commentaire complémentaires: